

DER ERYTHROZYTÄRE
DELTA-AMINOLÄVULINSÄURE-METABOLISMUS
UNTER EINWIRKUNG VON
HÄMSTOFFWECHSELPRODUKTEN

WILHELM PAPE

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554601_0044

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin (Hämatologie) der
Universität München und dem
Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und
Umweltforschung, Assoziation mit EURATOM, München
(Vorstand: Prof. Dr. W. STICH)

Der erythrozytäre Delta-Aminolävulinsäure-Metabolismus unter
Einwirkung von Hämstoffwechselprodukten.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

WILHELM PAPE

München

1973



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. W. Stich

Dekan:

Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

24. 7. 1973

Gewidmet
meinen Eltern

I. Einleitung und Fragestellung

II. Untersuchungsgut und Methodik

III. Ergebnisse

1. D.-Aminolävulinsäure-Metabolismus bei Gesunden und
bei Anämie-Patienten

2. D.-Aminolävulinsäure-Metabolismus unter Zusatz von
Hämstoffwechselprodukten

IV. Diskussion

V. Zusammenfassung

VI. Literatur

I. Einleitung und Fragestellung

Der erythrozytäre Delta-Aminolävulinsäure-Metabolismus ist aus methodischen Gründen quantitativen Studien schwer zugänglich. Die meist verwendeten Konzentrationen der Delta-Aminolävulinsäure (Ala), die bei einmaliger Zugabe zum Inkubationsbeginn gute analytische Studien ermöglichten, lagen nahe dem Sättigungsbereich der Delta-Aminolävulinsäure-Dehydrase (Ala-D.) und offenbar auch der übrigen, die Ala metabolisierenden Enzyme, so daß Ergebnisse unter diesen Bedingungen nicht den intraerythrozytären Synthese-Verhältnissen entsprachen. Durch methodische Modifikationen und Untersuchungen im konzentrierten, nativen Hämolytat unter Dauerinfusion kleiner Ala-Mengen wurden Versuchsanordnungen geschaffen, die geeignet erscheinen, den intraerythrozytären Stoffwechselweg der Ala in großen Zügen zu quantifizieren und vergleichende Gegenüberstellungen bei Gesunden und verschiedenen Anämieformen vorzunehmen. Außerdem konnten unter diesen weitgehend physiologischen Bedingungen Hemmversuche mit Hämsyntheseprodukten (Porphyrine, Hämoglobin, Hämiglobin) durchgeführt werden, die zur Klärung der Frage der Feed-back-Regulation der Hämsynthese auf der Stufe der Ala-D. beitragen können.

II. Untersuchungsgut und Methodik

Sämtliche ökologischen Studien des Ala-Metabolismus bei gesunden Probanden, verschiedenen Anämien und unter Einwirkung von Hämstoffwechselprodukten lag das nachfolgend beschriebene Inkubationsverfahren zugrunde:

Durch einen Perfusor konstant geregelte Infusion von insgesamt 239 μg Ala ($3\frac{1}{5}$ μg Ala/ml aqua dest.) in konzentriertes natives Erythrozyten-Hämolysat (8 ml Erythrozyten, 16 ml aqua dest.) innerhalb von ca 30 min bei 38 C, nachdem ein anfänglicher Ala-Spiegel von 230 $\mu\text{g}\%$ (etwa der Ala-Konzentration junger hämsynthetisierender Zellen des erythropoetischen Systems entsprechend) hergestellt worden war. Ein geringer Unterdruck im System von 120 mm Hg diente einer leichten Hemmung der Porphobilinogenase, um kleinere synthetisierte Porphobilinogenmengen (Pbg) noch erfassen zu können.

Aus diesen Inkubaten konnten bestimmt werden der für die Hämsynthese utilisierte Ala-Anteil (Pbg, Porphyrine) und der durch Metabolisierung außerhalb der Hämsynthese abgebaute Ala-Anteil (non-heme-pathway). Um die echten Stoffwechsel-Daten zu erhalten (Ala-heme-pathway, Ala-non-heme-pathway) wurden die absoluten Ergebnisse auf relative, an mittleren Ala-Spiegel orientierte, umgerechnet. Dies erscheint aufgrund der Kurzzeit-Inkubationsbedingungen mit konstanter Ala-Infusion bei gleichem Ala-Ausgangsspiegel und den relativ geringen Schwankungen des Ala-Spiegels berechtigt, obwohl ein streng linearer Anstieg oder Abfall des Ala-Spiegels nicht besteht. Durch im Einzelfall ständig identisches Ala-Angebot wird der Prozentsatz der beiden Ala-Stoffwechselwege hiervon nicht berührt. Die Bestimmung der Hämpräkursoren im Inkubat erfolgte nach

entsprechend (8) modifizierten Methoden (6,10).

Hämstoffwechselprodukte für Hemmungsversuche wurden ca 1/2 Stunde vor Inkubationsbeginn zugesetzt. Es wurden verwendet Koproporphyrin I und III, Uroporphyrin I und III (SIGMA Chemicals , St. Louis, Missouri 63118 USA),

Protoporphyrin, Hämoglobin (Calbiochem, Los Angeles, California 90016)
Hämoglobin (Serva, Heidelberg).

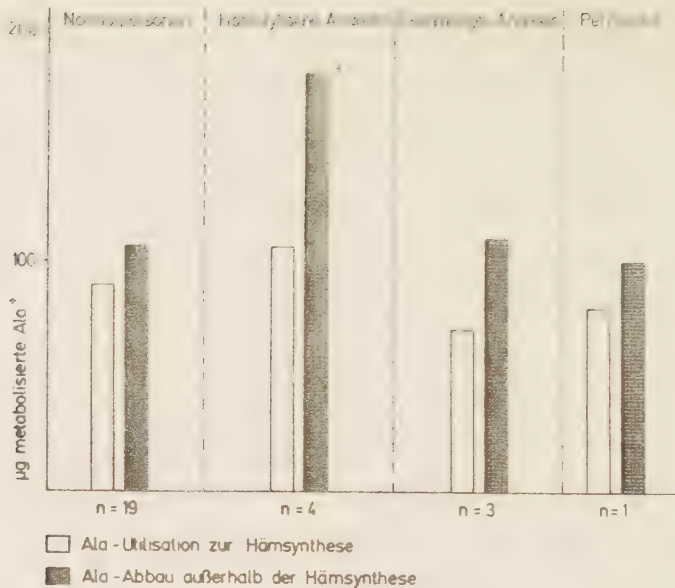
Die in den Inkubaten vorhandene Konzentration an Hämstoffwechselprodukten betrug für Uroporphyrine 0,1 µg%, Koproporphyrine

0,5 µg%, Protoporphyrin 8 µg% und Hämoglobin ca 10 g%, somit für Porphyrine unter 10 % der Konzentration in hämsyntheseaktiven Blutzellen und für Hämoglobin unter 1/3 der normalen erythrozytären Konzentration.

III. Ergebnisse

1. Ala-Metabolismus bei Gesunden und bei Anämie-Patienten

Die in Abb. 1 aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß in Erythrozyten nur etwas weniger als die Hälfte der verfügbaren Ala zur Hämsynthese verwendet wird (47,7 %; Standardabweichung SD = 13,3; n=19); dieser Anteil nimmt im retikulozytenreichen Blut (100-400 %, Hämolytische Anämien entsprechend Abb.1 weiter ab (37,4 %; SD 11,7; n=4), während der größere Anteil der Ala den non-heme-pathway geht. Überträgt man diese Tendenz auf die hämsynthetisierenden jungen Zellen der Knochenmark-Erythropoese, so kann auf einen Ala-Metabolismus mit weniger als 20 % Utilisation für die Hämsynthese geschlossen werden. In Übereinstimmung mit retikulozytosebedingter Steigerung der maximalen Ala-D.-Aktivität bei hämolytischen Anämien (1), war auch unter unseren Bedingungen die Ala-Uti-



1

Ala-Metabolismus bei gesunden Er. ...
 ...; Inkubationsbedingung ...
 * = signifikanter Unterschied zu Normal ...

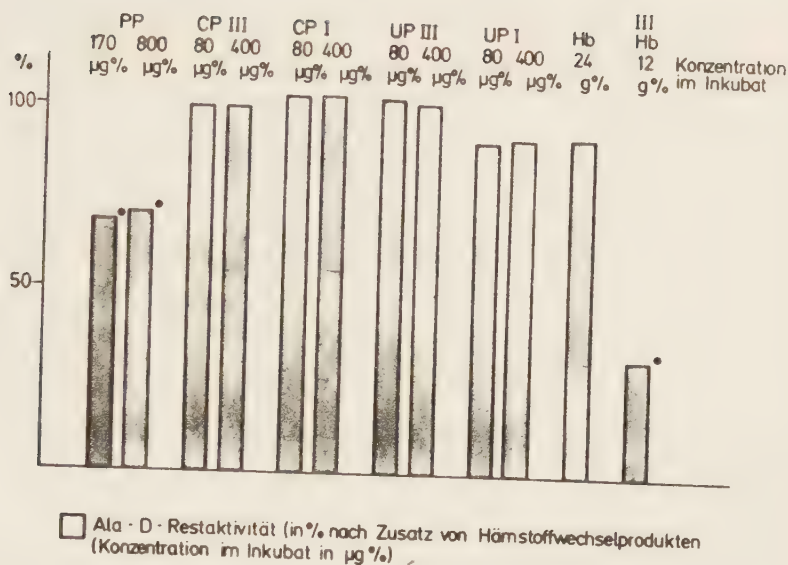


Abb. 2

Prozentuelle Ala-D.-restaktivität (heme-pathway) unter Einwirkung von Hämstoffwechselprodukten in den aufgeführten Konzentrationen; Inkubationsbedingungen entsprechend Methodik. * = signifikanter Unterschied zu Normalpersonen ($p < 0,05$). PP = Proto-, CP = Kopro-, UP = Uroporphyrin; I/III = Isomere; Hb = Hämoglobin, Hb-III = Hämioglobin.

lisation für die Hämsynthese bei hämolytischen Anämien gesteigert (Abb.1), während sie bei Eisenmangel-Anämien leicht vermindert erschien. Eisenmangel-Anämien zeigen eine leichte, bei der untersuchten Fallzahl nicht signifikante Verschiebung innerhalb des Ala-Metabolismus zugunsten des non-heme-paths. Ein Fall perniziöser Anämie (Vit-B₁₂-Mangel) ließ keine Verschiebung der Relationen innerhalb des Ala-Metabolismus erkennen. Von der zur Hämsynthese verwendeten Ala waren bei Normalpersonen 58 %, bei hämolytischen Anämien 86 % auf der Stufe der Porphyrine zu finden; Eisenmangel-Anämien und die Perniciosa verhielten sich etwa wie Normalpersonen.

2. Ala-Metabolismus unter Zusatz von Hämstoffwechselprodukten

Abb 2 stellt den Einfluß der zugegebenen Substanzen auf die Ala-D. dar. Von den zugesetzten Porphyrinen führte nur Protoporphyrin in Konzentrationen von 170 µg% bzw. 800 µg% unter den beschriebenen Inkubationsbedingungen zu einer signifikanten leichten Hemmung der Ala-D. (Restaktivität 65-70 %), bei einer Konzentration von ca 30 µg% bestand eine Restaktivität von ca 75 %. Die höchste Protoporphyrinkonzentration entsprach einer ca 100-fachen Zunahme gegenüber der Vergleichsprobe und reichte damit in die Größenordnung von Protoporphyrinen hinein, der Krankheitsgruppe mit der größten intraerythrozytären Porphyrin-Anreicherung. Die übrigen zugesetzten Porphyrine (Koproporphyrin I und III, Uroporphyrin I und III) zeigten keine signifikante Wirkung auf die Ala-D., selbst in Konzentrationen entsprechend erythropoetischen Porphyrinen, wobei die Anfangs-Konzentration maximal etwa das 1000-5000 fa

Abb. 1 : Restaktivität (%) des Ala-Hetab. in den Inkubaten der Hämoglobinose (Abb. 1) unter Einwirkung von Hämstoffwechselprodukten; Mittelwerte (%) aus 3 Inkubationen mit verschiedenen erythrozyten-Hämolysaten; Abweichung von Wp. 0,01.

Ala non-heme-pathway	Konzentration im Inkubat	JP (μg^2) 170 300		GPII (μg^2) 80 400		GPI (μg^2) 80 400		UIII (μg^2) 80 400		RPI (μg^2) 80 400	
		44*	50*	104	110	72	114	118	111	73	76

* = signifikante Abweichung von der Norm ($p < 0,05$)

gegenüber den Vergleichs-Inkubaten betrug.

Eine Erhöhung der Hämoglobin-Konzentration von ca 10 g% in Inkubate auf 24g% führte ebenfalls zu keiner signifikanten Hemmung der Ala-D. Eine sehr deutliche signifikante Ala-D.-Hemmung war dagegen durch Zusatz von Hämoglobin in einer Konzentration von 12 g% zu erzielen.

In Tab. 1 sind die auf den mittleren Ala-Spiegel (Methodik) bezogenen Aktivitäten des Ala-Abbaues außerhalb der Häm-synthese (non-heme-pathway), in Tab. 2 die prozentuelle Restaktivität verglichen mit der ursprünglichen Aktivität dargestellt. Von den zugesetzten Substanzen zeigen ebenfalls nur Protoporphyrin in höherer Konzentration und Hämoglobin eine leichte bis mäßige Einschränkung dieses Stoffwechselweges. Die Ergebnisse weisen eine relativ hohe Streuung mit Werten von z.T. deutlich über 100 % auf, was wohl durch die hohe Empfindlichkeit u.a. im Zusammenhang mit den Beziehungen dieses pathways zu feinstrukturell verankerten metabolisierenden Aktivitäten (Citrat-Zyklus) steht, so daß in der Deutung von erhöhter oder verminderter Aktivität Vorsicht angebracht erscheint.

Wegen der damit verbundenen Veränderungen der relativ physiologischen Bedingungen im Inkubat durch Reduktionsmittel(SH-, Amalgam etc.), haben wir auf Hemmversuche mit Koproporphyrinogen III und Uroporphyrinogen III verzichtet. Zwei Proben mit besonders hoher endogener Koproporphyrinogen-III-Syntheserate (Endkonzentration ca 200-250 µg%), die eine normale maximale Ala-D.-Aktivität aufwiesen, zeigten keine Reduktion der Ala-D.-Aktivität, so daß auf eine wesentliche Hemmwirkung von Koproporphyrinogen III nicht geschlossen werden kann.

Unter Zusatz der angeführten Substanzen kam es vielfach zu unsystematischer Verminderung des bei Normalpersonen unter

unteren Versuchsaufstellungen ermittelten Prozentsatzes synthetisierter Porphyrine auf Werte unter 10%. Ob hier eine Hemmwirkung auf die Porphobilinogenase besteht, oder, was wahrscheinlicher ist, eine Schädigung des relativ empfindlichen, lichtsensiblen uroporphyrin-synthetisierenden Enzymsystems im Rahmen der Zugabe und Gegenionisierung der Substanzen, konnte nicht entschieden werden.

IV. Diskussion

Der Versuch, Studien des Ala-Metabolismus unter weitgehend physiologischen Bedingungen durchführen zu können, hat zu dem beschriebenen Inkubationssystem geführt. Die Ergebnisse zeigen, daß der Anteil des Ala-Abbaues außerhalb der Hämsynthese (non-heme-pathway) am intraerythrozytären Ala-Metabolismus wesentlich größer ist, als bisher angenommen wurde, was wohl auf die schwierige Beurteilbarkeit von Inkubationsstudien unter hohen, Sättigungsbedingungen nahen Ala-Konzentrationen zurückzuführen sein dürfte.

Durch das Vorhandensein eines offenbar sogar etwas dominierenden non-heme-pathways der Ala, insbesondere in jungen Zellen der Erythropoese, sind prinzipiell die Voraussetzungen für eine Regulation der Hämsynthese auf der Stufe der Ala-D. geschaffen, da beim Einsetzen regulierender Wirkungen oder Überproduktion (Porphyrie) eine unphysiologische Überschwemmung des Körpers bzw. hohe Verlustrate nicht auftritt.

Die vorliegenden Ergebnisse verschiedener Autoren (2,5,7) weisen auf hemmende Einflüsse von Häm, Hämoglobin, Protoporphyrin, Koproporphyrin III und Koproporphyrinogen III. Die

Untersuchungen wurden teils an verschiedenen gereinigten Enzympräparationen, zumeist jedenfalls unter Ala-D.-Sättigungsbedingungen durchgeführt (4). Einerseits kann bei gereinigten Enzympräparationen teilweise eine größere Hemmwirkung durch normalerweise an Trägerproteine gebundene Substanzen unterstellt werden, andererseits handelt es sich um kompetitive Hemmungen, die durch hohe Ala-Konzentrationen reversibel sind (2).

Die von uns ausgearbeiteten Inkubationsbedingungen erscheinen daher geeignet, über eventuelle Hemmwirkungen quantitative Aussagen zu machen, da sie die wesentlichen Voraussetzungen hierfür mitbringen - Inkubation im konzentrierten, nativen Hämolytat unter physiologischem, kontinuierlichen Ala-Angebot. Hierbei zeigt von den Porphyrinen nur das Protoporphyrin, auch bei Porphyrin-entsprechenden Konzentrationen, eine leichte signifikante Hemmwirkung sowohl auf die Ala-D. wie auf den non-heme-pathway. Eine wesentliche regulierende Funktion des Protoporphyrin-Spiegels auf dieser Hämsynthese-Stufe ist hieraus nicht zu erkennen. Eine Erhöhung der Hämoglobin-Konzentration von 10 g% (ca $\frac{1}{3}$ der intraerythrozytären Endkonzentration) auf 24 g% führte zu keiner Hemmung der Ala-Utilisation. Der endgültige intraerythrozytäre Hämoglobin-Gehalt reguliert sich daher nicht auf der Basis einer hämoglobin-konzentrations-abhängigen Ala-D.-Aktivität ein. Die Feststellung, daß hohe Koproporphyrinogen-III-Syntheseraten im Inkubat, nicht zur absoluten oder relativen Verminderung der Ala-Utilisation führen, spricht beim Menschen gegen das Vorliegen einer deutlichen Ala-D.-Regulation durch die intraerythrozytäre Konzentration dieses Zwischenproduktes der Hämsynthese, während mäßige Hemeigenschaften im Hämolytat von Mäuse- und Rattenblut sowie

Enzympräparate, einzeln oder kombiniert, gegen hohen Koproporphyrinogen-III-Konzentrationen (5×10^{85} mol angegeben wurden (7).

V. Zusammenfassung

Inkubationsstudien des Delta-Aminolävulinsäure-(Ala)-Metabolismus unter weitgehend physiologischen Bedingungen (konzentriertes, natives Erythrozytenhämolyat, konstante Zufuhr kleiner Ala-Mengen entsprechend einem Spiegel von $230 \mu\text{g}\%$) zeigten bei 19 gesunden Probanden, daß der Ala-Metabolismus außerhalb der Hämsynthese (non-heme-pathway) wesentlich intensiver ist, als bisher angenommen wurde und die erythrozytäre Ala-Utilisation für die Hämsynthese (heme-pathway) noch etwas übertrifft ($52,3$ $47,7 \%$). Im retikulozytenreichen Blut (Hämolytische Anämien) war der Anteil des non-heme-pathway der Ala noch größer ($62,6$ $37,4 \%$), so daß in jungen, zur Hämsynthese befähigten Blutzellen die Ala-Utilisation zur Hämsynthese weniger als $1/5$ des gesamten Ala-Metabolismus betragen dürfte. Eisenmangel-Anämien ließen eine leichte Zunahme des non-heme-pathways erkennen (nicht signifikant), ein Fall von Perniciosa wies einen normentsprechenden Ala-Metabolismus auf.

Hemmversuche unter diesen Inkubationsbedingungen mit Protoporphyrin, Koproporphyrin I und III, Uroporphyrin I und III, Hämoglobin und Hämiglobin ergaben nur eine leichte signifikante Hemmung der Ala-D. (30% Aktivitätsminderung) und des non-heme-pathways der Ala durch Protoporphyrin ($800 \mu\text{g}\%$) sowie eine mäßig signifikante Hemmung der Ala-D. (ca 70% Aktivitätsminderung) und des non-heme-pathway der Ala durch Hämiglobin ($12 \text{ g}\%$). Hohe endogene Koproporphyrinogen-III-Syntheseraten führten nicht

zur Ala-D.-Reaktion. Eine deutliche Autoregulation der erythrozytären Hämsynthese durch die untersuchten Hämstoffwechselprodukte war auf der Stufe der Ala-D. nicht nachweisbar.

VI. Literatur

1. Battistini V.,
Morrow, J.J.,
Ginsburg D.,
Thompson G.,
Moore M.R.,
Goldberg A. Erythrocyte Delta-Aminolaevulic Acid
Dehydrase Activity in Anaemia
Brit.J. Haemat. 20 (1971) 177
2. Calissano P.,
Bonsignore D.,
Cartasegna C. Control of Haem Synthesis by Feedback
Inhibition on Human-Erythrocyte-Delta-
Aminolaevulate Dehydratase
Biochem J. 101 (1966) 550
3. Dowdle E.,
Mustard P.,
Spong N.,
Eales L. The Metabolism of (5-¹⁴C)-Delta-Aminolae-
vulic Acid in Normal and Porphyric
Human Subjects
Clin. Sci. 34 (1968) 233
4. Gibson K.D.,
Neuberger A.,
Scott J.J. The Purification and Properties of Delta
Aminolaevulic Acid Dehydrase
Biochem.J. 61 (1955) 618
5. Heilmeyer L.,
Clotten R.,
Heilmeyer L.jun. Die Störungen der Bluthämsynthese:
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1964
6. Mauzerall D.,
Granick S. The occurrence and determination of delta-
aminolevulinic acid and porphobilinogen
in urin
J.biol.Chem. 219 (1961) 338
7. Satyanarayana M.R.
Padmanaban G.,
Muthukrishnan S.,
Sarma P.S. Feedback Inhibition of d.-Aminolaevulina-
te Dehydratase by Coproporphyrinogen III
Indian J.Biochem. 7 (1970) 123
8. Schmidt D.,
Dech G.,
Fikentscher R.,
Stich W. Untersuchungen über die fetale Hämsynthese
in verschiedenen Blutbildungsphasen
Blut i.Druck
9. Schmidt D.,
Schymura G.,
Stich W. Zur Entstehung der Delta-Aminolävulinacie-
urie bei der Bleivergiftung
Publikation in Vorbereitung
10. Schwartz S.,
Bergh M.H.,
Bossenmaier J.,
Dinsmore Determination of Porphyrins in biological
Materials
Meth. Biochem.Anal. 8 (1958) 253
11. Stich W. Physiologie und Pathologie der Hämsynthese
Fol. haemat. N.F. 9 (1964) 197

Herrn Prof. Stich habe ich für die gebotenen Arbeits-
möglichkeiten an seinem Institut, Herrn Dr.D. Schmidt
für Betreuung während der Arbeiten zu danken.

LEBENS LAUF

Am 10.9.1947 bin ich in Paderborn geboren worden als Sohn des Arztes Dr. med. Georg Pape und seiner Ehefrau Marianne, geb. Hofmann.

Nach dem Besuch der Volksschule von 1954 bis 1958 trat ich zum Humanistischen Gymnasium St. Xaver in Bad Driburg über, wo ich am 3.11.1966 das Reifezeugnis erhielt.

Von 1966 bis 1969 studierte ich vorklinische Medizin an der Universität Marburg/Lahn, wo ich nach fünf Semestern die ärztliche Vorprüfung am 26.3.1969 bestand.

Seit dem 15.4.1969 studiere ich klinische Medizin an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München, Abschluß durch das Staatsexamen im Herbst 1972.

